中红侧沟茧蜂化学感受蛋白 MmedCSP1 的结合特征

张 帅[1,2], 张永军[1,*], 苏宏华[1], 高希武[2], 郭予元[1,*]
(1. 中国农业科学研究院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094;
2. 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094)

摘要: 化学感受蛋白是一类存在于昆虫化学感受器中的可溶性蛋白, 被认为与昆虫识别外界化学信息有关。本研究使用 pGEX-4T-1 表达载体在 BL21 (DE3) 异源表达系统中表达中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* 化学感受蛋白 MmedCSP1, 并通过亲和层析法纯化得到去表达标签的 MmedCSP1; 使用 bis-ANS 作为荧光配基, 在荧光分光光度计上研究它与 50 种气味标样的结合特征, 从而得到此类化学感受蛋白在中红侧沟茧蜂嗅觉识别中识别气味的种类。结果表明: MmedCSP1 只能与水杨酸甲酯、戊烷、罗勒烯、β-紫罗兰酮、3, 4-二甲基苯甲醛、2-己酮和叶醇结合。但只有脂类化合物 β-紫罗兰酮能在浓度为 1 mmol/L 下将 bis-ANS 从 MmedCSP1 中替换 50%, β-紫罗兰酮与 MmedCSP1 的结合常数为 16.89 μmol/L。这些结果提示 MmedCSP1 参与中红侧沟茧蜂对水杨酸甲酯、戊烷、罗勒烯、β-紫罗兰酮、3, 4-二甲基苯甲醛、2-己酮和叶醇等气味的识别过程, 且在不同气味中的识别过程中对于气味的运输能力有差异。

关键词: 中红侧沟茧蜂; 化学感受蛋白; 原核表达; 荧光结合; β-紫罗兰酮
中图分类号: Q965　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2009)08-0838-07

Binding characterization of chemosensory protein MmedCSP1 in *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae)

ZHANG Shuai[1,2], ZHANG Yong-Jun[1,*], SU Hong-Hua[1], GAO Xi-Wu[2], GUO Yu-Yuan[1,*] (1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China; 2. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Chemosensory proteins (CSPs), which are assumed to be related with the process of storing and releasing the chemical odors for insects, belong to a class of small soluble polypeptides in insect chemical receptors. In this study, chemosensory protein of *Microplitis mediator* MmedCSP1 was expressed using pGEX-4T-1/BL21 (DE3) prokaryotic expression system, and then purified using GSTrap FF, and the binding characteristics of MmedCSP1 to 50 kinds of chemical molecules were further studied using bis-ANS (4, 4′-dianilino-1, 1′- binaphthyl- 5, 5′-sulfonate) as fluorescent probes. The results showed that MmedCSP1 could bind to methyl salicylate, pentane, ocimene, β-ionone, 3, 4-dimethylbenzaldehyde, 2-hexanone and *cis*-3-hexen-l-ol. However, only β-ionone replaced the bis-ANS of MmedCSP1 by 50%, and the binding constant was 16.89 μmol/L. These results suggest that MmedCSP1 is involved in the process of storing and releasing methyl salicylate, pentane, ocimene, β-ionone, 3, 4-dimethylbenzaldehyde, 2-hexanone and *cis*-3-hexen-l-ol for *M. mediator*, and has different transport capability in storing and releasing those odorants.

Key words: *Microplitis mediator*; chemosensory proteins; prokaryotic expression; fluorescent binding assays; β-ionone

在昆虫的嗅觉过程中, 外界气味分子在载体蛋白的帮助下穿过化学感受器中的极性的淋巴液, 到达感觉神经原, 与位于其上的气味受体作用从而产生嗅觉神经冲动, 不同载体蛋白运送不同种类的气味, 从而完成昆虫对气味的初步识别。目前在化学感受器淋巴液中已经发现两类水溶性蛋白能够作为

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871640); 植物病虫害生物学国家重点实验室项目(SKL2007SR01)
作者简介: 张帅, 男, 1981 年 4 月生, 河南正阳人, 博士研究生, 从事昆虫生化和分子生物学研究, Tel.: 010-62816306; E-mail: zhsjwl@163.com
* 通讯作者 Authors for correspondence, Tel.: 010-62894786; E-mail: yuyuanguo@hotmail.com; zyjwlx@163.com
收稿日期 Received: 2009-01-15; 接受日期 Accepted: 2009-05-03

气味分子和化学刺激物的载体，一类是气味结合蛋白(odorant binding proteins，OBPs)，其蛋白序列中有 6 个保守的半胱氨酸残基，具有相似的水溶性及次级结构，能够溶解和运输气味分子到达神经受体(Krautwurst *et al*.，1998；Wetzel *et al*.，2001；王桂荣等，2002；Hallem *et al*.，2004)。另一类水溶性蛋白是化学感受蛋白(chemosensory proteins，CSPs)。这类蛋白与气味结合蛋白同源性低，序列中只有 4 个保守的半胱氨酸残基，在昆虫各种化学感觉器官中表达，推测可能在感受化学刺激中起着重要的作用(Pikielny *et al*.，1994；Steinbrecht *et al*.，1995；Ban *et al*.，2002)。

气味结合蛋白和化学感受蛋白能够结合信息素和其他化学信息物质，它们的这种结合特征有助于我们了解其生理功能。对于它们的结合特征的研究有很多种方法，包括同位素标记、荧光结合实验(fluorescent binding assays)和挥发气味结合法（volatile odorant binding assay)(Vogt and Riddiford，1981；Briand *et al*.，2001；Campanacci *et al*.，2001；Ban *et al*.，2002；Mohl *et al*.，2002)。实验中所用蛋白一般是通过异源表达，然后纯化得到的(Pelosi *et al*.，2006)。在荧光结合实验中，可以使用蛋白内源荧光与外源荧光作为报告因子。内源荧光要求肽链中结合位点含有色氨酸(Trp)；外源荧光常用荧光配基有 1-AMA（1-aminoanthracene)，1-NPN （N-phenyl-1-naphthylamine） 和 ANS （1-anilinonaphthalene-8-sulphonic acid)。bis-ANS（4,4′-dianilino-1,1′-binaphthyl-5,5′-sulfonate）是 ANS 的二聚体，与 ANS 相比 bis-ANS 结合蛋白质的能力更强。

在棉花-害虫-天敌三级营养关系中，气味是它们传递信息的主要途径(郭予元，1998)。中红侧沟茧蜂寄主广泛，我国已知有棉铃虫 *Helicoverpa armigera*、粘虫 *Mythimna separata*、小地老虎 *Agrotis ypsilon*、豆小卷叶蛾 *Matsumuraeses phaseoli* 和银纹夜蛾 *Argyrogramma agnata* 等低龄幼虫，在国外还记录 39 种寄主(王德安等，1984)。在中红侧沟茧蜂寻找寄主或补充营养时需要识别复杂的气味信息，不同的气味结合蛋白和化学感受蛋白结合不同的气味是其识别气味的基础(Pelosi *et al*.，2006)。本研究中，我们使用纯化得到的重组中红侧沟茧蜂 *Microplitis mediator* 化学感受蛋白 MmedCSP1，以 bis-ANS 为荧光报告因子，研究该蛋白与 50 种气味标样的结合特征，这 50 种气味标样包括 14 种棉花气味(于惠林等，2007)和其他植物常有的气味分子，从而了解此类化学感受蛋白在中红侧沟茧蜂嗅觉过程中参与识别的气味种类。

1　材料与方法

1.1　样品与试剂

中红侧沟茧蜂由河北农林科学院提供。反转录试剂盒购自 Promega 公司，限制性内切酶、Pyrobest DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司，表达载体 pGEX-4T-1 为本实验室保存，克隆感受态菌株 DH5α 与表达感受态菌株 BL21(DE3)购自天根生化科技有限公司，脱盐柱、5 mL GSTrap FF 预装柱与凝血酶购自 GE 公司。蛋白荧光探针 4，4′-dianilino-1，1′-binaphthyl-5,5′-sulfonate(bis-ANS)与气味标样为 Sigma 公司产品(表 1)，F96 荧光分光光度计为上海棱光技术有限公司产品。

1.2　蛋白表达与纯化

根据中红侧沟茧蜂化学感受蛋白 MmedCSP1 基因序列(GenBank 登录号：EF397518)，设计一对扩增引物：CSPes，5′-gtGGATCCGCGACTACTAAAACCTACACC-3′；CSPer，5′-gtGAATTCTTAAACATTAATTCCTTTAGCT-3′(下划线序列为酶切位点，之前为保护碱基)。以中红侧沟茧蜂触角 cDNA 为模板，使用高保真酶克隆基因片段，连接在 pGEX-4T-1 表达载体上，转入工程菌 BL21(DE3)中进行表达。

在蛋白表达中使用 500 mL LB 进行诱导表达，表达后收集菌体，使用超声波破碎后，离心收集包涵体。包涵体使用含有 0.2% Triton 的 50 mmol/L Tris 缓冲液漂洗 2 次后，溶于 2.5 mL 浓度为 5 mol/L 的盐酸胍中。然后加入 2.5 mL 含有 10 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)的 Tris-HCl(pH 8.0)，在室温下摇 30～60 min 后加入 1 mL 200 mmol/L 的胱氨酸溶液，在室温下孵育 10 min 以氧化剩余的 DTT。反应结束后加入 10 倍体积的含有 5 mmol/L 半胱氨酸的 100 mmol/L Tris-HCl(pH 8.0)，室温下通风摇24 h。6 000 g 离心 30 min 去除沉淀的蛋白，在 200 mmol/L Tris-HCl(pH 8.5)溶液中 4℃ 透析过夜。蛋白使用 5 mL GSTrap FF 预装柱进行纯化并使用凝血酶切除 GST 标签，纯化后使用脱盐柱脱盐，蛋白溶于 pH 为 7.4 的 20 mmol/L Tris 缓冲液中(Prestwich，1993)。

1.3　Western 印迹检测

先将蛋白从 SDS-PAGE 胶上转移到 NC 膜上，然后用封闭液(PBST ＋5% 脱脂牛奶)封闭过夜；接着与鼠抗GST单抗室温反应1.5 h,用洗脱液

表 1 50 种气味标准化合物的纯度及来源

Table 1 Purity and source of 50 standard chemical compounds

气味标样 Standard chemical compounds	纯度 Purity	来源 Source
绿叶气味 Green leaf volatiles		
2-已酮 2-Hexanone*	98%	Sigma-Aldrich
3-已酮 3-Hexanone *	98%	Aldrich
叶醇 *Z*-hex-3-en-1-ol	≥98%	Aldrich
2-乙基已醇 Isooctanol *	≥99%	Sigma-Aldrich
脂类化合物 Aliphatic compounds		
庚酸乙酯 Ethyl heptanoate	≥98%	Aldrich
辛醛 Octanal *	99%	Aldrich
癸醛 Decanal *	≥98%	Sigma
紫罗兰叶醛 *E*-2-*Z*-6-nonadienal	95%	Aldrich
乙酸叶醇酯 *Z*-3-hexenyl acetate	≥98%	Aldrich
乙酸壬酯 Nonyl acetate	≥99%	Aldrich
戊烷 Pentane	≥99%	Sigma-Aldrich
辛烷 Octane	≥99%	Sigma-Aldrich
异戊醇 Isoamyl alcohol	≥98%	Aldrich
2-壬酮 2-Nonanone	≥97%	Aldrich
十一烷 Hendecane *	≥99%	Aldrich
2-十一醇 2-Undecanol	≥98%	Aldrich
2-庚酮 2-Heptanone	99%	Sigma-Aldrich
顺-3-壬烯-1-醇 *Z*-3-nonen-1-ol	95%	Aldrich
2-辛酮 2-Octanone	98%	Aldrich
壬醛 Nonanal *	≥95%	Aldrich
β-紫罗兰酮 β-ionone	90%	Aldrich
仲辛醇 2-Octanol	≥96%	Aldrich
芳香化合物 Aromatic compounds		
苯乙酸乙酯 Ethyl phenylacetate	≥99%	Aldrich
苯甲醛 Benzaldehyde *	≥99%	Sigma-Aldrich
苯甲酸 Benzoic acid	≥99%	Sigma-Aldrich
水杨酸甲酯 Methyl salicylate	≥99%	Sigma-Aldrich
苯乙酸甲酯 Methyl phenylacetate *	≥98%	Aldrich
4-乙基苯甲醛 4-Methylbenzaldehyde	≥97%	Aldrich
苯乙酮 Acetophenone	≥98%	Aldrich
3,4-二甲基苯甲醛 3, 4-Dimethylbenzaldehyde	98%	Aldrich
萜类化合物 Terpenoids		
蒈烯 Carene	90%	Aldrich
α-松油烯 α-terpinene	≥95%	Aldrich
罗勒烯 Ocimene	≥90%	Aldrich
α-蒎烯 α-pinene *	99%	Aldrich
α-石竹烯 Humulene	≥98.0%	Aldrich
β-蒎烯 β-pinene *	99%	Aldrich
石竹烯 Caryophyllene *	98%	Aldrich
月桂酸乙酯 Ethyllaurate	≥98%	Sigma
月桂烯 Myrcene *	≥98%	Aldrich
香芹烯 Limonene	97%	Sigma
s-香芹烯 s-limonene	96%	Aldrich
β-香茅醇 β-citronellol	98%	Aldrich
橙花叔醇 Nerolidol	≥96%	Aldrich
橙花醇 Nerol	≥97%	Aldrich
柠檬醛 Citral	≥96%	Aldrich
香叶醇 Geraniol	98%	Aldrich
反,反-金合欢醇 *E*,*E*-farnesol	96%	Aldrich
香芹醇 Carveol	≥95%	Aldrich
香芹酚 Carvacrol	≥98%	Aldrich
杂环化合物 Heterocyclic compound		
吲哚 Indole*	≥99%	Aldrich

* 棉花中挥发物所含有的成分 Standard chemical compounds present in cotton volatiles.

PBST 洗膜 3 次；加入使用 PBST 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗，室温反应 1.5 h，用洗脱液洗膜 3 次；最后将 NC 膜置于含有 DAB 的显色液中显色至条带清晰，将膜放入蒸馏水中终止显色反应。

1.4　重组 MmedCSP1 蛋白的荧光特征

实验在 F96 荧光分光光度计上进行，所用容器为宽 1 cm 的四通石英杯，发射波长为 365 nm，狭缝宽度为 10 nm，灵敏度设为 3。

将 2 mL 溶于 20 mmol/L 的 Tris 缓冲液（pH 7.4）浓度为 4 μmol/L 重组化学感受蛋白放入样品室内，记录荧光发射情况。在 bis-ANS 与重组化学感受蛋白结合后发射荧光实验中，将 5 μmol/L bis-ANS 加入到 4 μmol/L 溶于 20 mmol/L 的 Tris 缓冲液（pH 7.4）中重组化学感受蛋白溶液中，记录荧光发射情况。

1.5　结合实验

在 4 μmol/L 溶于 20 mmol/L 的 Tris 缓冲液（pH 7.4）中重组化学感受蛋白溶液中加入浓度从 1 μmol/L 到 6 μmol/L 的 bis-ANS，记录荧光发射情况。使用波长为 495 nm（最大荧光发射处）荧光强度，使用 Scatchard 方程计算 bis-ANS 与重组化学感受蛋白的结合常数。

在研究气味标样与重组化学感受蛋白的结合常数时，使用竞争结合实验。在竞争结合试验中，使用 bis-ANS 作为荧光报告因子，5 μmol/L 的 bis-ANS 与 4 μmol/L 重组化学感受蛋白混合。将 50 种气味标样分别溶于甲醇溶液中，配制成浓度为 1 mmol/L 样品。将气味样品逐步加入到 bis-ANS 与重组化学感受蛋白混合液中，记录荧光变化情况。根据 IC_{50} 值（竞争配基能替换 50% 的 bis-ANS 时的浓度）计算竞争结合剂结合常数。公式如下：$KD = [IC_{50}]/(1+[\text{bis-ANS}]/K_{\text{bis-ANS}})$，其中 [bis-ANS] 为未结合 bis-ANS 浓度，$K_{\text{bis-ANS}}$ 为 CSP/bis-ANS 的结合常数（Ban *et al.*, 2003）。

2　结果与分析

2.1　重组 MmedCSP1 蛋白的纯化及 Western 印迹检测

含有 pGEX/MmedCSP1 的 BL21（DE3）菌经 IPTG 诱导后，可产生 40 kD 左右的特异蛋白质条带，而未经诱导的含有 pGEX-4T-1 载体和 pGEX/MmedCSP1 的 BL21（DE3）菌在相应位置没有产生特异的条带。电泳检测表明 MmedCSP1 在上清和包涵体中均有表达，但在包涵体中的表达量远远大于上清中表达量，所以选择包涵体进行蛋白纯化。表达蛋白经过亲和层析纯化及凝血酶切后得到较纯的（97.2%）的 MmedCSP1 蛋白，浓度达到 4.0 mg/mL。为了进一步检测表达产物是否为含有 GST 的融合蛋白，以鼠抗 GST 为一抗，以辣根过氧化酶标记的羊抗鼠为二抗，对切下的 26 kD 蛋白进行 Western 印迹分析，结果表明该条带与 GST 抗体发生很强的交叉反应，表明融合蛋白得到了表达（图 1）。

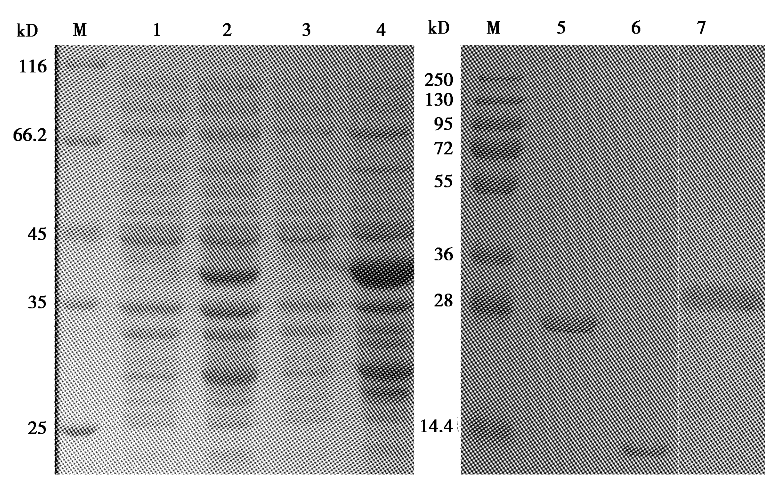


图 1　MmedCSP1 表达及纯化产物 SDS-PAGE 电泳（A）及 Western 印迹杂交（B）分析

Fig. 1　SDS-PAGE electrophoretic (A) and Western blot (B) analysis of expressed MmedCSP1 before and after purification

M：蛋白质分子量标准 Protein molecular marker；1：未诱导的含 pGEX-4T-1 的 BL21 菌体 Uninduced *Escherichia coli* containing pGEX-4T-1；2：诱导后的含 pGEX/MmedCSP1 的 BL21 菌体 *E. coli* containing pGEX/ MmedCSP1 induced by 0.2 mmol/L IPTG；3：未诱导的含 pGEX/MmedCSP1 的 BL21 菌体 Uninduced *E. coli* containing pGEX/MmedCSP1；4：包涵体 Inclusion body；5：凝血酶切下的 GST 标签 Thrombin-cleaved GST；6：纯化后的 MmedCSP1 蛋白 Purified MmedCSP1；7：GST 标签 Western 印迹杂交 GST Western blot.

2.2 重组 MmedCSP1 蛋白的荧光特征

荧光探针 bis-ANS 单独存在时没有荧光产生。重组 MmedCSP1 蛋白在 365 nm 激发光下能够产生内源荧光，在 450 nm 处产生荧光量最强，加入荧光探针 bis-ANS 后，内源荧光消失，在 495 nm 产生强于内源荧光量 3.77 倍的荧光(图 2)。

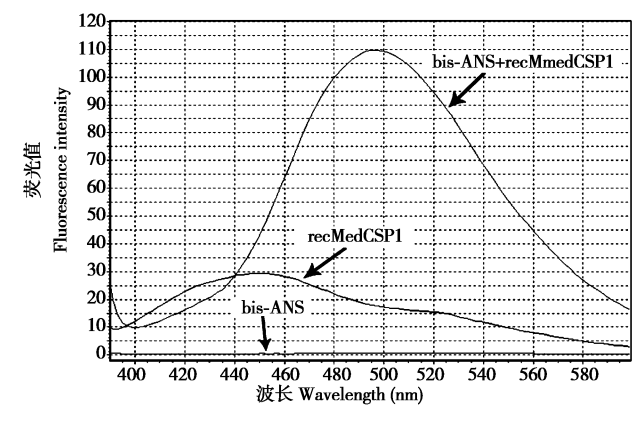


图 2 重组 MmedCSP1 荧光特征

Fig. 2 Fluorescence of recMmedCSP1

2.3 结合实验

通过 Scatchard 方程计算出 MmedCSP1 与 bis-ANS 的结合常数为 3.62 μmol/L(图 3)。使用 bis-ANS 作为荧光配基，在荧光分光光度计上研究与 50 种气味的结合特征。发现 MmedCSP1 只能与水杨酸甲酯、戊烷、罗勒烯、β-紫罗兰酮、3，4-二甲基苯甲醛、2-己酮、叶醇结合，但只有 β-紫罗兰酮能在浓度为 1 mmol/L 下将 bis-ANS 从 MmedCSP1 中替换 50%（图 4）。经过计算，β-紫罗兰酮与 MmedCSP1 的结合常数为 16.89 μmol/L。

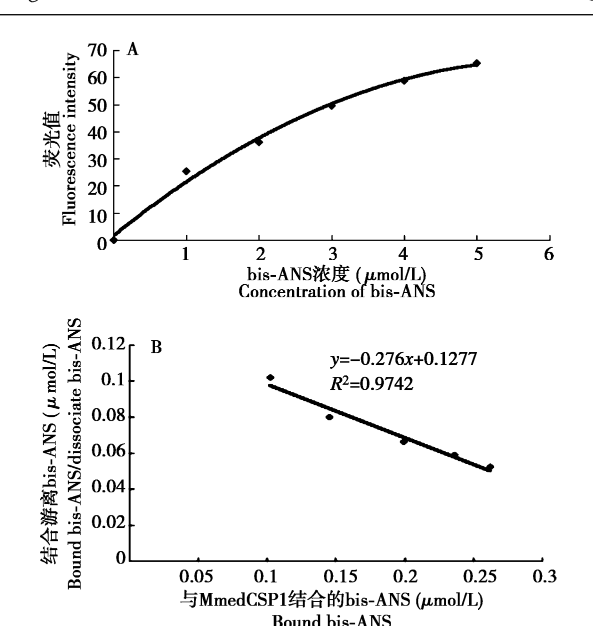


图 3 bis-ANS 与重组蛋白 MmedCSP1 的结合

Fig. 3 Binding of bis-ANS to recMmedCSP1

A：在 4 μmol/L 重组蛋白溶液中不同探针 bis-ANS 浓度下的荧光量 Fluorescence of different concentrations of bis-ANS in 4 μmol/L rec-MmedCSP1；B：重组蛋白与 bis-ANS 结合 Scatchard 方程 Scatchard plot of bis-ANS binding to rec-MmedCSP1.

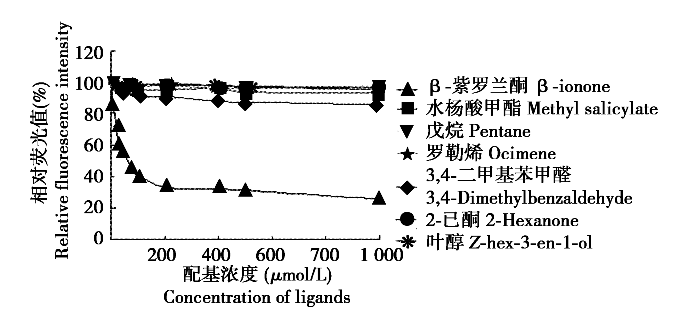


图 4 重组蛋白 MmedCSP1 与配基的竞争结合试验

Fig. 4 Quenching of fluorescence of bis-ANS in recMmedCSP1 by ligands

3 讨论

在原核表达中，蛋白的表达主要存在于包涵体中，上清中表达量不能满足实验的需要，所以选择包涵体进行重折叠后纯化，且这种方法纯化得到的蛋白与上清中表达的可溶蛋白和天然结构蛋白三维结构与功能没有差异(Prestwich，1993)。由于 MmedCSP1 氨基酸序列中含有色氨酸，所以在 365 nm激发光下在 450 nm 处产生最强荧光，同时可以判断该蛋氨酸残基位于疏水囊中。加入 bis-ANS 后蛋氨酸残基发射荧光被淬灭，可以证明 bis-ANS 结合在 MmedCSP1 的疏水囊中。由于外源荧光探针荧光量比内源荧光量强，所以选择外源荧光探针作为荧光报告因子。

在使用的 50 种气味标样中，有 4 种绿叶气味，18 种脂类化合物，8 种芳香类化合物，19 种萜类化合物和 1 类杂环类化合物。其中的 14 种棉花气味标样中，有 3 种绿叶气味，4 种脂类化合物，2 种芳香类化合物，4 种萜类化合物和 1 类杂环类化合物。绿叶气味、脂类化合物和芳香类化合物是植物固有气味，而萜类和杂环类化合物为虫害诱导气味的重要组成部分，在吸引害虫天敌方面起作用(Visser，1986)。

在 MmedCSP1 与气味标样的结合实验中，MmedCSP1 能够结合绿叶气味，萜烯类和杂环类气味，但只有 β-紫罗兰酮与 MmedCSP1 的结合能力较强。可以看出 MmedCSP1 有很广的结合谱，但又有

特异性强结合的配基。在能与 MmedCSP1 结合的配基中，水杨酸甲酯、β-紫罗兰酮和 3，4-二甲基苯甲醛为花香气味物质，2-己酮和叶醇为绿叶气味物质。这两种物质为植物具有的基本物质，是植食性昆虫定位寄主的基本物质（杜家纬，2001）也是寄生蜂补充营养和寻找潜在寄主定位时重要物质。罗勒烯是近年来发现的一种植物通讯信号分子，现已了解到许多植物种类如棉花、烟草、玉米等受节肢食草动物取食后，都会释放出罗勒烯这一化学成分来吸引害虫天敌（Farmer，2001）。

使用 1-AMA 作为荧光探针，发现甘蓝夜蛾 *Mamestra brassicae* 信息素结合蛋白 MbraPBP1 能与甘蓝夜蛾性信息素中所有 3 种成分相结合，结合常数为 0.17 ~ 0.29 μmol/L。另外 MbraPBP1 还能与脂肪酸结合，特别是与棕榈酸（palmitic acid），结合常数为 0.12 μmol/L（Campanacci *et al*.，2001）。胡蜂 *Polistes dominulus* 的气味结合蛋白对橄榄酸酰氨（oleoamide）的结合有很高的特异性。无论是顺反异构体或反式酰胺与相应的饱和脂肪酸与该气味结合蛋白的结合常数都比与橄榄酸酰氨的结合常数大一个数量级（Calvello *et al*.，2003）。东亚飞蝗 *Locusta migratoria* 气味结合蛋白与油酸酰胺（oleamide）的结合常数也是微摩尔级，不过它的结合谱更宽，能与很多芳香气味结合（Ban *et al*.，2003）。佛罗里达蟑螂 *Leucophaea maderae* 的气味结合蛋白是现在唯一报道的能与亲水配基结合的种类（Riviereet *et al*.，2003）。果蝇 *Drosophila melanogaster* 的气味结合蛋白 LUSH 在与乙醇结合构象不发生改变，而在与果蝇信息素 11-*cis*-vaccenyl acetate（cVA）结合时构象发生改变（Kim *et al*.，1998；Xu *et al*.，2005）。

参 考 文 献（References）

Ban LP, Scaloni A, D'Ambrosio C, Zhang L, Yan YH, Pelosi P, 2003. Biochemical characterisation and bacterial expression of an odorant-binding protein from *Locusta migratoria*. *Cell. Mol. Life Sci*., 60: 390 – 400.

Ban LP, Zhang L, Yan YH, Pelosi P, 2002. Binding properties of a locust's chemosensory protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun*., 293: 50 – 54.

Briand L, Nespoulous C, Huet JC, Takahashi M, Pernollet JC, 2001. Ligand binding and physico-chemical properties of ASP2, a recombinant odorant-binding protein from honeybee (*Apis mellifera* L.). *Eur. J. Biochem*., 268: 752 – 760.

Calvello M, Guerra N, Brandazza A, D'Ambrosio C, Scaloni A, Dani FR, Turillazzi S, Pelosi P, 2003. Soluble proteins of chemical communication in the social wasp *Polistes dominulus*. *Cell. Mol. Life Sci*., 60: 1 933 – 1 943.

Campanacci V, Krieger J, Bette S, Sturgis JN, Lartigue A, Cambillau C, Breer H, Tegoni M, 2001. Revisiting the specificity of *Mamestra brassicae* and *Antheraea polyphemus* pheromone-binding proteins with a fluorescence binding assay. *J. Biol. Chem*., 276: 20 078 – 20 084.

Du JW, 2001. Plant-insect chemical communication and its behavior control. *Acta Phytophysiologica Sinica*, 27 (3): 193 – 200. [杜家纬，2001. 植物-昆虫间的化学通讯及其行为控制. 植物生理学报，27 (3): 193 – 200]

Farmer EE, 2001. Surface-to-air signals. *Nature*, 411: 854 – 856.

Guo YY, 1998. Researches on Cotton Bollworm. China Agriculture Press, Beijing. [郭予元，1998. 棉铃虫的研究. 北京：中国农业出版社]

Hallem EA, Fox A, Zwiebel LJ, Carlson JR, 2004. Olfaction: Mosquito receptor for human-sweat odorant. *Nature*, 427: 212 – 213.

Kim MS, Re PPA, Smith DP, 1998. LUSH odorant binding protein mediates chemosensory responses to alcohols in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 150: 711 – 721.

Krautwurst D, Yau KW, Reed RR, 1998. Identification of ligands for olfactory receptors by functional expression of a receptor library. *Cell*, 95: 917 – 926.

Mohl C, Breer H, Krieger J, 2002. Species-specific pheromonal compounds induce distinct conformational changes of pheromone binding protein subtypes from *Antheraea polyphemus*. *Invert. Neurosci*., 4: 165 – 174.

Pelosi P, Zhou JJ, Ban LP, Calvello M, 2006. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cell. Mol. Life Sci*., 63: 1 658 – 1 676.

Pikielny CW, Hasan G, Rouyer F, Rosbash M, 1994. Members of a family of *Drosophila* putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs. *Neuron*, 12: 35 – 49.

Prestwich GD, 1993. Bacterial expression and photoaffinity labeling of a pheromone binding protein. *Protein Sci*., 2: 420 – 428.

Riviere S, Lartigue A, Quennedey B, Campanacci V, Farine JP, Tegoni M, Cambillau C, Brossut R, 2003. A pheromone-binding protein from the cockroach *Leucophaea maderae*: Cloning, expression and pheromone binding. *Biochem. J*., 371: 573 – 579.

Steinbrecht RA, Laue M, Ziegelberger G, 1995. Immunolocalisation of pheromonebinding protein and general odorant-binding protein in olfactory sensilla of the silk moths *Antheraea* and *Bombyx*. *Cell Tissue Res*., 282: 203 – 217.

Visser JH, 1986. Host odor perception in phytophagous insects. *Ann. Rev. Entomol*., 31: 121 – 144.

Vogt RG, Riddiford LM, 1981. Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature*, 293: 161 – 163.

Wang DA, Nan LZ, Sun X, Li XZ, 1984. Study on bionomics of *Microplitis* spp. larval parasitic wasp of *Helicoverpa armigera*. *Natural Enemies of Insect*, 6(4): 211 – 218. [王德安，南留柱，孙洗，李小珍，1984. 棉铃虫低龄幼虫寄生蜂-侧沟茧蜂生物学研究. 昆虫天敌，6(4): 211 – 218]

Wang GR, Guo YY, Wu KM, 2002. Progress in the studies of antenna

odorant binding proteins of insects. *Acta Entomologica Sinica*, 45 (1): 131 - 137. [王桂荣, 郭予元, 吴孔明, 2002. 昆虫触角气味结合蛋白的研究进展. 昆虫学报, 45 (1): 131 - 137]

Wetzel CH, Behrendt HJ, Gisselmann G, Stortkuhl KF, Hovemann B, Hatt H, 2001. Functional expression and characterization of a *Drosophila* odorant receptor in a heterologous cell system. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98: 9 377 - 9 380.

Xu P, Atkinson R, Jones DN, Smith DP, 2005. *Drosophila* OB PLUSH is required for activity of pheromone-sensitive neurons. *Neuron*, 45: 193 - 200.

Yu HL, Zhang YJ, Pan WL, Guo YY, Gao XW, 2007. Identification of volatiles from field cotton plant under different induction treatments. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 18(4): 859 - 864. [于惠林, 张永军, 潘文亮, 郭予元, 高希武, 2007. 田间条件下不同处理棉花挥发性物质的收集及定性和定量鉴定. 应用生态学报, 18 (4): 859 - 864]

(责任编辑: 邓艳)